



دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل  
دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی

## عنوان:

بررسی فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در میان  
ایزوله‌های انتروکوک جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان

امام خمینی<sup>(ره)</sup> از سال 91-95

استاد راهنما:

دکتر محسن ارزنلو

استاد مشاور:

دکتر هادی پیری دوگانه و دکتر بهنام محمدی قلعه بین

نگارنده:

سید حسین موسوی

شهریور 1396

شماره پایان نامه:

031

## سپاس و تقدیر:

به نام آن خدای پاک سبحان که از خاک آفرید اینگونه انسان

خداوند بزرگ را شاکرم که لطف خود را شامل حال من نمود تا بتوانم با لطف استادان بزرگوار به پایان این مرحله از تحصیل برسم. بارالها من با یاد تو به تقرب می‌جویم، نخست خداوند مهربان را شکر نموده و سپس لازم میدانم به مصداق «من لم یشکرالمخلوق لم یشکرالخالق» در برابر استاد فرهیخته جناب آقای دکتر محسن ارزنلو که با راهنمایی‌اشان و تشویف‌های صمیمانه خود راه گشای اینجانب بوده‌اند، و با کرامتی چون نورخورشید سرزمین دل را روشنایی بخشیدند، با نهایت فروتنی سرتعظیم فرودآورده، با اینکه نمی‌توانم یکی از هزاران حق ایشان را ادا کنم به خاطر تمام خوبی‌هایشان صمیمانه سپاسگذارم.

ازاستادان ارجمند جناب آقای دکتر هادی پیری بعنوان مشاور اول و دکتر بهنام محمدی بعنوان مشاور دوم بوده‌اند، که گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کارساز و سازنده، بارور ساختند و همواره میکوشند تا به امثال من دانش بیافزایند، تقدیر و تشکر می‌نمایم و امید دارم که بتوانم حق شاکردی خود را در مقابل سپاس بیکران‌شان به جا بیاورم.

از زحمات و راهنمایی‌های ارزشمند دوست گرامی جناب آقای دادرس ملکی که در راستای انجام این پروژه در طول یک سال گذشته در بخش میکروب شناسی در بیمارستان امام خمینی (ره) تشکر و قدردانی می‌نمایم.

با تقدیر و درود فراوان خدمت پدرم که مثل کوه استوار بود و مادر عزیزم که مثل چشمه، زلال بود و هر دو پلی بودن بین دو کوه برای گذر از من.

به این امید که در پناه باری تعالی و رهنمایی‌های همیشگی اساتید محترم، بتوانم پویا و مفید برای کشور عزیزمان ایران باشم.

سیدحسین موسوی

شهریور 1396

بررسی فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در میان ایزوله‌های انتروکوک جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) از سال 91-95

### چکیده:

زمینه و هدف: انتروکوک ها از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی هستند که به شکل ذاتی در برابر برخی از کلاس های آنتی بیوتیکی مقاوم هستند و قادرند مکانیسم های مقاومت را براحتی کسب نمایند. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در میان ایزوله‌های انتروکوک جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) از سال 91-95 اجرا شد.

روش کار: در این مطالعه از 111 ایزوله انتروکوک استفاده شد. گونه های فکالیز و فاسیوم توسط تکنیک PCR از سایر گونه ها تفکیک شدند. مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین و استرپتومایسین از طریق روش غربالگری در محیط تعیین شد. MIC آمپیسیلین با استفاده از روش رقت در آگار تعیین شد. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های تیگسیکلین، کونوپریستین/دالفوپریستین و لینزولید با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی شد.

نتایج: به ترتیب 59، 25 و 27 درصد ایزوله ها به گونه های فکالیز، فاسیوم و سایر گونه ها تعلق داشتند. از میان گونه های فکالیز، فاسیوم و سایر به ترتیب (۶۱.۰۱٪)، ۳۶ (۷۲٪) و ۱۳ (۴۸.۱۴٪) به سطوح بالای جنتامایسین و (۵۵.۹۳٪)، ۳۳ (۶۴٪)، ۱۶ و (۵۱.۸۵٪) ۱۴ به سطوح بالای استرپتومایسین مقاوم بودند. به ترتیب (۴۷.۴۵٪)، ۲۸ (۶۰٪)، ۱۵ و (۵۱.۸۵٪) ۱۴ درصد ایزوله های فکالیز، فاسیوم و سایر بطور همزمان به سطوح بالای هر دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند. ژن کد کننده آنزیم تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) در تمامی ایزوله های مقاوم ردیابی شد. مقاومت به آمپیسیلین به ترتیب در (40/74) 11، (28 %) 7 و (1/69 %) 1 مورد متعلق به گونه های فکالیز، فسیوم و سایر مشاهده شد.

نتیجه گیری: درصد قابل توجهی از ایزوله های انتروکوک جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام (ره) به سطوح بالای استرپتومایسین، جنتامایسین و یا هر دو آنتی بیوتیک مقاوم هستند. همچنین مقاومت به آمپی سیلین نیز در میان ایزوله ها مشاهده شد.

کلمات کلیدی: انتروکوک، مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین، استرپتومایسین ، آمپیسیلین

## فهرست مطالب :

فصل اول.....Error! Bookmark not defined.

طرح تحقیق.....Error! Bookmark not defined.

1-1-مقدمه و بیان مسئله.....Error! Bookmark not defined.

2-1 تعریف واژه‌ها:.....Error! Bookmark not defined.

1-2-1 انتروکوک:.....Error! Bookmark not defined.

2-2-1 مقاومت با سطوح بالای جنتامایسین:.....Error! Bookmark not defined.

3-2-1 مقاومت با سطوح بالای استرپتومایسین:.....Error! Bookmark not defined.

4-2-1 مقاومت به آمپی سیلین:.....Error! Bookmark not defined.

3-1 اهداف:.....Error! Bookmark not defined.

1-3-1 اهداف کلی:.....Error! Bookmark not defined.

2-3-1 اهداف اختصاصی:.....Error! Bookmark not defined.

4-3-1 اهداف کاربردی:.....Error! Bookmark not defined.

3-1-5 (د) سؤالات تحقیق:.....Error! Bookmark not defined.

فصل دوم.....Error! Bookmark not defined.

کلیات و پیشینه تحقیق.....Error! Bookmark not defined.

1-2 میکروبیولوژی انتروکوک:.....Error! Bookmark not defined.

2-2 انتشار، اکولوژی اپیدمیولوژی:.....Error! Bookmark not defined.

3-2 فاکتورهای ویروالانس:.....Error! Bookmark not defined.

1-3-2 ماده تجمع کننده (Agg):.....Error! Bookmark not defined.

2-3-2 همولیزین (سیتولیزین):.....Error! Bookmark not defined.

3-3-2 پروتئین سطحی انتروکوکال:.....Error! Bookmark not defined.

4-3-2 هیالورونیداز، ژلاتیناز و سرین پروتئاز:.....Error! Bookmark not defined.

4-2 بیماری زایی انتروکوک ها:.....Error! Bookmark not defined.

- 5-2 مکانیسم‌های پاتوژنیک:.....Error! Bookmark not defined.
- 6-2 کلونیزاسیون:.....Error! Bookmark not defined.
- 7-2 درمان عفونت‌های انتروکوک:.....Error! Bookmark not defined.
- 8-2 مقاومت آنتی بیوتیکی در انتروکوک‌ها:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-8-2 مقاومت ذاتی:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-8-2 مقاومت اکتسابی:.....Error! Bookmark not defined.
- 9-2 بتالاکتام‌ها:.....Error! Bookmark not defined.
- 10-2 گلیکوپپتیدها:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-10-2 مقاومت ذاتی:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-1-10-2 مقاومت تیپ VanC:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-1-10-2 مقاومت تیپ VanE و VanD:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-10-2 مقاومت اکتسابی:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-2-10-2 مقاومت تیپ Van A:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-2-10-2 مقاومت تیپ VanB:.....Error! Bookmark not defined.
- 3-2-10-2 مقاومت تیپ VanG:.....Error! Bookmark not defined.
- 11-2 آمینوگلیکوزیدها:.....Error! Bookmark not defined.
- 11-2 ساختمان و مکانیسم عمل:.....Error! Bookmark not defined.
- 12-2 مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-12-2 تغییر در ساختار ریبوزوم:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-12-2 تغییر در ساختار آنتی بیوتیک به روش آنزیمی:.....Error! Bookmark not defined.
- 13-2 آمینوگلیکوزید فسفوترانسفراز (APH):.....Error! Bookmark not defined.
- 14-2 آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (AAC):.....Error! Bookmark not defined.
- 15-2 انتقال ژن‌های مقاومت در بین انتروکوک‌ها:.....Error! Bookmark not defined.
- 16-2 پیشینه تحقیق:.....Error! Bookmark not defined.
- 1-16-2 مطالعات جهان:.....Error! Bookmark not defined.
- 2-16-2 مطالعات ایران:.....Error! Bookmark not defined.

فصل سوم ..... Error! Bookmark not defined.

مواد و روش‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

1-3 اطلاعات مربوط به متدولوژی پایان نامه: ..... Error! Bookmark not defined.

3-3 افتراق گونه‌های فکالیز و فاسیوم از سایر گونه‌ها: ..... Error! Bookmark not defined.

4-3 شناسایی گونه‌ها: ..... Error! Bookmark not defined.

5-3 آماده سازی پرایمرها: ..... Error! Bookmark not defined.

6-3 تکثیر ژن‌های مورد مطالعه: ..... Error! Bookmark not defined.

7-3 الکتروفورز: ..... Error! Bookmark not defined.

7-3 – 1 الکتروفورز DNA روی ژل آگارز: ..... Error! Bookmark not defined.

7-3 – 2 روش انجام کار الکتروفورز: ..... Error! Bookmark not defined.

8-3 تعیین الگوی مقاومت دارویی: ..... Error! Bookmark not defined.

11-3 تعیین مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین و استرپتومایسین: ..... Error! Bookmark not defined.

12-3 تلقیح باکتریها در محیط و تفسیر نتایج: ..... Error! Bookmark not defined.

13-3 تعیین MIC آمپی سیلین: ..... Error! Bookmark not defined.

15-3 نگه داری باکتری‌های جدا شده: ..... Error! Bookmark not defined.

16-3 روش تهیه محیط نوترینت براث: ..... Error! Bookmark not defined.

17 – 3 تعیین MIC: ..... Error! Bookmark not defined.

1-17-3 رقت در آگار (آگار دایلوشن): ..... Error! Bookmark not defined.

2-17-3 مواد و وسایل: ..... Error! Bookmark not defined.

18-3 استفاده از سویه‌های رفرانس: ..... Error! Bookmark not defined.

19-3 پرایمر های ژن عامل مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین : ..... Error! Bookmark not defined.  
defined.

20-3 متغیرها: ..... Error! Bookmark not defined.

فصل چهارم ..... Error! Bookmark not defined.

نتایج ..... Error! Bookmark not defined.

نتایج آزمایش PCR برای شناسایی گونه های فکالیز و فاسیوم:.....**Error! Bookmark not defined.**

مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین و استرپتومایسین:.....**Error! Bookmark not defined.**

بررسی ژنوتیپی مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین:.....**Error! Bookmark not defined.**

نتایج تعیین MIC آمپی سیلین:.....**Error! Bookmark not defined.**

2-5 نتیجه گیری:.....**Error! Bookmark not defined.**

3-5 پیشنهادات:.....**Error! Bookmark not defined.**

رفرنس:.....**Error! Bookmark not defined.**

خلاصه لاتین :..... 96



### فهرست اشکال:

جدول (3-1): توالی پرایمرها انتروکوکوس فکالیز و فاسیوم:.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول (3-2): برنامه حرارتی واکنش PCR جهت شناسایی انتروکوکوس فکالیز و فاسیوم:..... **Error!**

**Bookmark not defined.**

جدول 3-3: متغیرها:.....**Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-1: نمونه نتایج ژل الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی انتروکوک فکالیز. اندازه قطعه ژن تکثیر

شده 941 pb می باشد که در کنار مارکر وزن مولکولی نشان داده شده است..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-2: نمونه نتایج ژل الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی انتروکوک فسیوم. اندازه قطعه ژن تکثیر

شده 550pb می باشد که در کنار مارکر با وزن مولکولی نشان داده شده است. ... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-1: فراوانی مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین و استرپتومایسین و مقاومت توام به هر دو آنتی بیوتیک  
در میان گونه های انتروکوک جدا شده از نمونه های بالینی.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-2 توزیع ایزوله های انتروکوکوس فکالیز به تفکیک بخش های بیمارستان ... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-3 توزیع ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم به تفکیک بخش های بیمارستان..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-4 توزیع ایزوله های انتروکوکوس غیرفکالیز غیر فاسیوم به تفکیک بخش های بیمارستان .... **Error!**  
**Bookmark not defined.**

جداول 4-5، 4-6 و 4-7 توزیع فراوانی ایزوله های غیر فکالیز-غیر فاسیوم انتروکوک را بر مبنای نوع نمونه

نشان می دهد.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-5 توزیع فراوانی ایزوله های انتروکوکوس فکالیز به تفکیک نوع نمونه ها ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-6 توزیع ایزوله های انتروکوکوس فکالیس به تفکیک نوع نمونه ها..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-7 توزیع ایزوله های انتروکوکوس فکالیس به تفکیک نوع نمونه ها..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-3: نمونه تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی مقاومت به سطوح بالای جنتامایسین.

.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-8. تعیین MIC آمپی سیلین به روش رقت در آگار برای گونه های انتروکوک جدا شده از نمونه های

بالینی:.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-9. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های انتروکوک جداشده از نمونه های بالینی..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-10. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های انتروکوک فکالیس جداشده از نمونه های بالینی

.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-11. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های انتروکوک فاسیوم جداشده از نمونه های بالینی

.....**Error! Bookmark not defined.**

جدول 4-12. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های انتروکوک های غیر فکالیس و غیر فاسیوم جداشده از

نمونه های بالینی.....**Error! Bookmark not defined.**

### فهرست علائم اختصاری:

AAC	Aminoglycoside Acetyltransferases
APH	Aminoglycoside Phosphotransferasees
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic Acid
HLGR	High level of Gentamicin Resistance
ICU	Intensive Care Unit
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodcil Sulfate